

ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПРОМОТОРНОГО ФРАГМЕНТА ГЕНА GSTP1

У цій статті викладено метод з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який запропоновано для одержання GC-багатої промоторної ділянки гена глутатіон-S-трансферази P1-1 (GSTP1) людини. Роботу проведено в рамках проекту вивчення регуляції транскрипції гена GSTP1 у клітинах плаценти людини. Запропоновані модифікації стандартного методу можуть бути корисними для ампліфікації будь-яких GC-багатих промоторних регіонів та інших ділянок генома.

Вступ

Глутатіон-S-трансферази - це велика родина ферментів, які каталізують електрофільне приєднання небілкового тіолу глутатіона до нуклеофільних ксенобіотиків [1]. Утворення глутатіонових кон'югатів у більшості випадків веде до зниження токсичності чужорідних сполук і полегшує їх виведення з клітини за допомогою спеціальних АТФ-залежних транспортних систем [2, 3]. У клітинах людини існує 4 класи цитозольних

глутатіонтрансфераз - GSTA, GSTM, GSTP, GSTT та один клас мітосомальних ферментів [4].

Нашу увагу привернула глутатіон-S-трансфераза класу P, яка відіграє важливу роль у процесах канцерогенезу [2] та у формуванні множинної стійкості пухлинних клітин до дії хіміотерапевтичних препаратів [3]. Так, на ранніх етапах неопластичні клітини не експресують GSTP, але з розвитком процесу експресія цього гена зростає, і клітини таким чином набувають здатності знешкоджувати ліки [4].

Регуляція експресії GSTP1 відбувається на рівні транскрипції, стабільності мРНК та на післятрансляційному рівні [4-8]. Регуляція транскрипційної активності гена здійснюється транскрипційними факторами, а також шляхом зміни рівня метилювання GC-острівців у промоторній ділянці гена [7]. У промоторі гена GSTP виявлено консенсусні послідовності, які є сайтами впізнавання для транскрипційних факторів AP-1, Sp1 (2 сайти), NF- κ B [9,10]. Численні дослідження пухлинних клітин показали, що зв'язування транскрипційних факторів з промотором цього гена є тканиноспецифічним [11]. Проте чіткої картини цих взаємодій і досі не відтворено, як і не показано, які процеси лежать в основі тканиноспецифічної регуляції транскрипції GSTP у нетрансформованих клітинах людини.

Об'єктом для дослідження регуляції експресії гена GSTP людини обрано плаценту, в якій глутаматіоН-S-трансфераза P1-1 є майже єдиною формою GST і становить близько 10 % усього білка цитозолу [12]. Попередніми дослідженнями нашої лабораторії показано, що в плаценті жінок з екологічно забруднених районів відбувається пригнічення експресії GSTP [13]. Нами було поставлено за мету з'ясувати за допомогою футпринтного аналізу та дослідження надзсуву з наявністю антитіл, які саме транскрипційні фактори задіяні в репресії GSTP1. Передумовою для реалізації цього завдання є виділення і клонування промоторного фрагмента гена, який містить усі консенсусні послідовності. Ампліфікація цієї ділянки за стандартних умов ПЛР є неможливою, оскільки промоторний регіон містить безліч вторинних структур, а весь ген є GC-багатим. Тому важливим завданням стала розробка методу ампліфікації цієї складної послідовності.

Методи

Виділення геномної ДНК. Для успішного проведення ПЛР суттєвим моментом є виділення геномної ДНК, вільної від РНК, білків, органічних та неорганічних забруднювачів. Нами було застосовано підхід, який дає змогу виділити високоочищену ДНК з крові людини без застосування органічних реактивів (фенол, хлороформ), домішки яких у препаратах ДНК є інгібіторами ПЛР. ДНК було виділено з ядер лейкоцитів згідно з рекомендаціями фірми Eppendorf. Після обробки ядер протеїназою K за стандартною процедурою олігопептиди осаджували додаванням 5M NaCl до кінцевої концентрації 1M, інкубацією суміші протягом 20 хв при -20 °C з наступним центрифугу-

ванням при 8000g упродовж 15 хв. До надосадової рідини додавали етанол до кінцевої концентрації 67 %, і ДНК намотували на паличку, підсушували і розчиняли у буфері TE. ДНК додатково очищали від низькомолекулярних сполук на спіноколках [14]. Концентрацію і чистоту ДНК перевіряли за оптичною густиною розчину при 260, 230 та 280 нм, розмір отриманих фрагментів визначали шляхом електрофорезу у 0,6 %-му агарозному гелі.

Обробка ДНК рестриктазою. ДНК піддавали обробці рестриктазою EcoRI в реакційній суміші, що містила 10 мкг ДНК в 33 мкл TE буфера, 2 мкл ферменту EcoRI і 4 мкл буфера ReAct 3 (Gibco BRL, США), 0,4 мкл 100x BSA (Pharmacia, США) і 0,6 мкл води. Суміш витримували 16 годин при 37 °C, після чого суміш витримувалась при 65 °C впродовж 25 хв для інактивації ферменту.

Ампліфікація фрагмента. Перший раунд ПЛР проводили з праймерами, які дають змогу одержати продукт, відповідний до ділянки від 957 до 1685 п. н. у послідовності гена і більший за необхідну промоторну ділянку. Послідовність прямого праймера - 5'-CTT TCC TCT TCC TGC TGT CTG-3', зворотного - 5'-CCA CAC GAC GGA GGG ATA AGG-3'. Ампліфікацію проводили в об'ємі 50 мкл з наявністю 100 нг ДНК, 0,5 мкМ кожного з олігонуклеотидів, 2,0 мкМ хлориду магнію, 5 %-го формаміду, 16 мкМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 200 мкМ кожного з чотирьох нуклеотидів, 50 мМ Трис-HCl pH 8,9, 0,01 %-го Tween-20 і 0,5 мкл (2,5 од.) Taq-полімерази. Фермент додавали після попередньої денатурації ДНК впродовж 7 хв при 95 °C. ПЛР складалася із 30 циклів, кожний з яких включав денатурацію при 95 °C 40 с, 2 хв відпалювання при 58 °C і елонгацію при 72 °C 50 с. На завершення елонгацію проводили впродовж додаткових 7 хв.

Другий раунд ампліфікації проводили з праймерами, які безпосередньо обрамляють регуляторну ділянку гена і є внутрішніми відносно першої пари праймерів. Прямий праймер мав послідовність 5'-CTT CCT GCT GTC GTT TAC TC-3', зворотний - 5'-ACT GGT GGC GAA GAC TGC-3'. Довжина продукту ПЛР становила 296 п. н. Реакцію проводили у суміші, яка ідентична за об'ємом і складом до суміші першого раунду ПЛР, за винятком того, що як матричну ДНК було взято 0,5 мкл продукту попередньої реакції. Ампліфікація складалася з денатурації ДНК упродовж 3 хв при 94 °C, 30 циклів по 30 с при 94 °C, 1,5 хв при 52 °C і 40 с при 72 °C кожний та завершальної елонгації при 72 °C впродовж 7 хв. 15 мкл реакційної суміші наносили на електрофорез

ділянку геля із смугою необхідного продукту вирізали і піддавали реампліфікації у вищезазначених умовах з метою збільшення кількості продукту.

Результати і обговорення

Як уже було зазначено, регуляторна ділянка гена глутатіон-S-трансферази Р, як і більшість промоторів, є GC-багатим регіоном, складним для ампліфікації. Проведення одноразової ПЛР з праймерами до промоторного фрагмента не дало змоги отримати й виділити специфічний продукт, незважаючи на оптимізацію послідовності праймерів, температурного режиму чи складу реакційної суміші. У зв'язку з цим нами були запропоновані модифікації стандартного методу для отримання необхідної ділянки.

Виділення ДНК без використання органічних сполук для депротейнізації і з додатковим очищенням на колонках дозволило отримати препарат високої якості ($OD_{260}/OD_{280} = 2,22$, $OD_{260}/OD_{230} = 6,66$). Перший раунд ампліфікації було проведено з парою праймерів, які підібрані до районів, що не утворюють вторинних структур і знаходяться на певній відстані від промоторної ділянки. ПЛР. Однак за цих умов утворювалася значна кількість неспецифічного продукту, якого не вдавалося уникнути, змінюючи температурний режим реакції. Для підвищення специфічності ампліфікації було введено такі модифікації:

1. Hot start - полімераза додається після первинної денатурації ДНК. Це запобігає аберантній праймер-матричній взаємодії при кімнатній температурі.

2. Перед ПЛР геномну ДНК обробляли рестриктазою, в даному випадку *EcoRI*, що зменшує довжину фрагментів ДНК, полегшує їх денату-

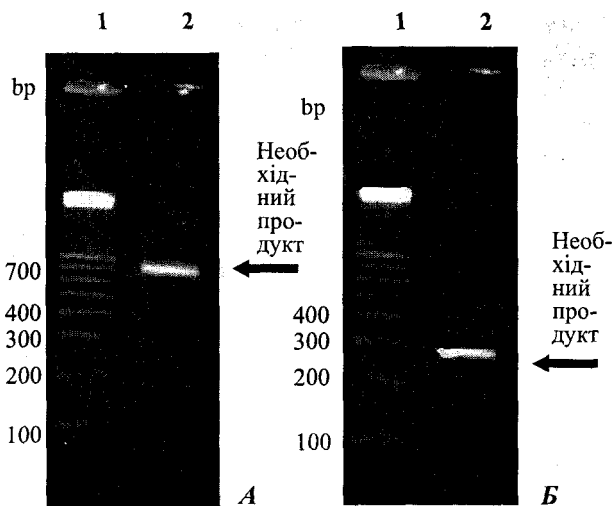


Рисунок. Аналітичний форе́з продуктів ПЛР:

A – продукт першого раунду ПЛР, проведеної за розроблених умов; *B* – продукт другого раунду ПЛР; доріжки: 1 – маркер 100bp DNA Ladder (Amersham Pharmacia, США); 2 – продукт ПЛР

рацію і при цьому не ушкоджує ділянку, яку ампліфікують.

3. Оскільки продукт ПЛР є GC-багатим, були випробувані різні домішки, які знижують температуру плавлення GC пар. Формамід у кінцевій концентрації 5 % виявився оптимальною домішкою.

Внаслідок ампліфікації було одержано виключно продукт необхідної довжини. Одержаний фрагмент був використаний для ПЛР з праймерами, які безпосередньо оточують регуляторну ділянку.

Таким чином, за допомогою модифікованого методу, який було запропоновано нами, було одержано фрагмент промотора гена *GSTP1* людини потрібної довжини. Використана схема може бути корисною для одержання за допомогою ПЛР важких для ампліфікації ділянок генома, зокрема промоторних регіонів.

1. Koob M., Decani W. Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates *II Chem.-Biol. Interactions.*- 1991.-V. 77.-P. 107-136.
2. Fields B., Morrow W. R., Doss A. J., etc. Overexpression of stably transfected human glutathione-S-transferase P1-1 protects against DNA damage by benzo[a]pyrene diol-epoxide in human T47D cells *II Molecular Pharmacology.*- 1998.- V. 54.- P. 298-304.
3. Kenneth D. T. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance *II Cancer Res.*- 1994.- V. 54.- P. 413-320.
4. Wilce C. J. M., Parker M. W. Structure and functions of glutathione-S-transferases *II Biochim. and Biophys. Acta.*- 1994.-№ 1205.-P. 1-18.
5. Xia C., Hu J., Kettler B., Taylor J. B. The organisation of the human *GSTP1-1* gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status *II Biochem. J.*- 1996.- V. 30.- P. 155-162.
6. Song L. L., Kosmeder J. W., Lee S. K., etc. Cancer chemopreventive activity by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II

detoxification enzymes *II Cancer research.*- 1999.- V. 59.- P. 578-585.

7. Moffl G. J., McLaren A. W., Wolf C. R. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms can regulate cell-specific expression of the human Pi-class glutathione S-transferase gene *II Biochemistry.*- 1997.- V. 327.- P. 91-95.
8. Song J. Z., Stirzaker J., Harrison J., etc. Hypermethylation trigger off the human *GSTP1* in prostate cancer cells *II Oncogene.*- 2002.- V. 21.- P. 1048-1061.
9. Morrow C. H., Cowan K. H., Goldsmith M. E. Structure of human glutathione S-transferase- π gene *II Gene.*-1989.- V. 75.- P. 3-11.
10. Moffat Gr. J., McLaren A. M., Wolf C. P. Functional characterization of the transcriptional silencer element, located within the human Pi class glutathione S-transferase promoter *II JBC.*- 1996.- V. 271.- P. 10740-20747.
11. Morrow C. S., Chiu J., Cowan K. H. Posttranscriptional control of glutathione-S-transferase ρ gene expression in human breast cancer cells *II J. Biol. Chem.*-1992.- V.267.-№ 15.-P. 10544-10550.

12. *St-Pierre M. V., Serrano M. A., Marias R. I. R., etc.* Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* - 2002. - V. 279. - P. R1495-R1503.
13. *Пріма В. І., Мельник В. А., Оболенська М. Ю.* та ін. Експресія двох ізоформ глутатіонтрансферази в плацентах жінок в районах України з різними ступенями радіоактивного забруднення // *БПіК* - 1997 - Т. 13. - № 2. - С. 113—115.
14. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular cloning // *CSH.* - 1989. - V. 3. - P. E.37-E.38 - Spun-Column Chromatography.

A. Slonchak, M. Obolenska

APPLICATION OF POLIMERASE CHAIN REACTION FOR GENERATION OF PROMOTER FRAGMENT OF GSTP1 GENE

This article expounds the method, which has been proposed for generation of GC-rich promoter fragment of human glutathione-S-transferase (GSTP1) gene applying PCR. This work has been performed as apart of the research project devoted to studying of GSTP1 gene transcription regulation in human placenta. Proposed modification of a standard method could be useful for amplification of GC-rich promoter regions in other genome loci.